

11 JAN 2001

508



EP00/6185

Mod. C.E. - 1-4-7

**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**  
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



REC'D 27 OCT 2000

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

N. MI99 A 001483

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito, inoltre*

Istanza di Correzione dell'Upica di Milano n. MIV002802 del 21/12/1999  
(pagg. 3).

R ma, li 29 LUG. 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

**MONTOMANI**

*Q. 142 Roman*

## AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO 1

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **INDENA S.p.A.**Residenza **Milano**

codice

04411780150

2) Denominazione

Residenza

codice

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Bianchetti Giuseppe ed altri**

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

**Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.**via **Rossini**n. **8**città **Milano**cap **20122**(prov) **MI**

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n. **A61K**

città

**31 445**

cap

(prov)

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci)

gruppo/sottogruppo

**"Derivati tassanici e procedimenti per la loro preparazione"**

## ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **Bombardelli Ezio**3) **Pontiroli Alessandro**2) **Gabetta Bruno**

4)

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

1)

2)

## SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **2** **PROV** n. pag. **33**

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) .....

Doc. 2) **0** **PROV** n. tav. **1**

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) .....

Doc. 3) **1** **RIS**lettera d'incarico, ~~prova di deposito~~ .....Doc. 4) **0** **RIS**

designazione inventore .....

Doc. 5) **0** **RIS**

documenti di priorità con traduzione in italiano .....

Doc. 6) **0** **RIS**

autorizzazione o atto di cessione .....

Doc. 7) **0**

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire **cinquecentosessantacinquemila#**

obbligatorio

COMPILATO IL **06/07/1999**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

**Banfi Paolo**CONTINUA SI/NO **NO**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

**MILANO**

codice

**15**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

**MI 99/A 001483**

Reg. A.

L'anno millenovecento

**NOVANTANOVE**

il giorno

**SEI**

del mese di

**LUGLIO**

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n.

**00**

fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripartato.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

DEPOSITANTE

timbro  
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

**CORTONESI MAURIZIO**

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M199 A00 1483

REG. A

DATA DI DEPOSITO

0607/1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

[ ]/[ ]/[ ]

D. TITOLO

**"DERIVATI TASSANICI E PROCEDIMENTI PER LA LORO PREPARAZIONE"**

L. RIASSUNTO

Vengono descritti un nuovo derivato tassanico ad attività antitumorale, un procedimento per la sua preparazione e un procedimento per la preparazione di derivati della 14- $\beta$ -idrossi-1,14-carbonato-baccatina III e V sostituiti in 13 da un residuo isoserinico.

M. DISEGNO



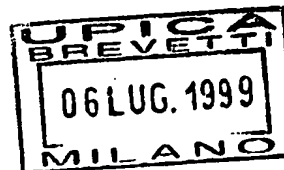
37 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

3/as "DERIVATI TASSANICI E PROCEDIMENTI PER LA LORO  
PREPARAZIONE"

a nome : INDENA S.p.A.

con sede in: Milano

MI 99 A 001483



\* \*

La presente invenzione riguarda un nuovo tassano utile come agente chemioterapico, le composizioni farmaceutiche che lo contengono e un procedimento per la preparazione di derivati della 14- $\beta$ -idrossi-1,14-carbonato-baccatine III e V, sostituiti in 13 da un residuo isoserinico.

I tassani costituiscono una delle più importanti classi di antitumorali sviluppati negli ultimi anni. La notevole efficacia del paclitaxel e del suo analogo docetaxel nel trattamento di molti tumori ha risvegliato l'interesse per le sostanze ad attività antimicrotubulare. Tuttavia, i tassani sono caratterizzati da un meccanismo d'azione singolare, dal momento che promuovono l'assemblaggio dei microtubuli e inibiscono la depolimerizzazione della tubulina.

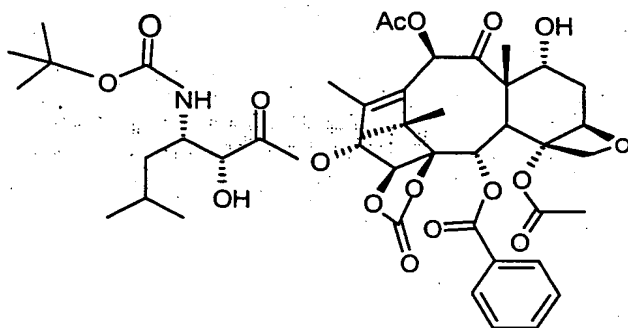
I difetti principali dei tassani attualmente impiegati sono: (a) insolubilità in acqua, che impone l'uso di specifici veicoli che possono provocare reazioni di ipersensibilizzazione, (b) tossicità limitanti il dosaggio, (c) sviluppo di meccanismi di resistenza. La resistenza cellulare ai tassani è stata messa in relazione al fenotipo MDR ("multidrug resistance") mediato dal trasportatore P-glicoproteico, da alterazioni della tubulina, e da cambiamenti nell'espressione di proteine regolatorie apoptotiche.

Per identificare nuove molecole attive dotate di maggiore solubilità e

migliore tollerabilità, sono stati sintetizzati tassani derivati dalla 14 $\beta$ -idrossi-10-deacetylbaecatina III e V.

Alcuni derivati della 14-idrossi baecatina III sostituiti in posizione 13 da residui isoserinici sono descritti in US 5705508, insieme ad un procedimento per la loro preparazione.

Si è ora trovato che il composto di formula (I), derivato della 14 $\beta$ -idrossi-1,14-carbonato-baecatina V,



(I)

è dotato di spiccata attività citotossica e antitumorale, ed è in grado di vincere la resistenza di linee cellulari che esprimono il fenotipo MDR.

Tale composto differisce dai derivati descritti nel brevetto americano sopra menzionato per l'idrossile in posizione 7, nel presente caso essendo in configurazione alfa. La 13-(N-Boc- $\beta$ -isobutylisoserinil)-14 $\beta$ -idrossi-baecatina III 1,14-carbonato, corrispondente al derivato identificato in US 5705508 come SB-T-101131, può essere utilizzata come prodotto di partenza per la preparazione del composto (I). In questo caso, tale derivato della baecatina III viene trattato con DBU (diazabicyclo[5,4,0] 7-undecene) in metanolo o THF o semplicemente lasciato in soluzione con metilene cloruro o solventi clorurati da soli o in presenza di alcoli alifatici quali metanolo, etanolo o

propanolo con allumina basica per un tempo variabile da un'ora a 14 giorni. Il composto avente configurazione beta al C-7 a pH neutro o debolmente basico si converte nel più stabile isomero alfa (derivato della baccatina V).

In alternativa, il composto (I) può essere preparato con un procedimento che consente anche di preparare il corrispondente epimero beta al C-7.

Tale procedimento (A) comprende le seguenti fasi:

- a) trasformazione della 14 $\beta$ -idrossi-10-desacetilbaccatina III o V nel derivato trietilsililato in posizione 7;
- b) preparazione del derivato 1,14 carbonato dal prodotto del passaggio (a);
- c) acetilazione selettiva dell'idrossile in 10;
- d) reazione del prodotto del passaggio (c) con l'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico;
- e) eliminazione dei gruppi protettori trietilsilile e dimetossibenzilidenico dal prodotto del passaggio (d).

Secondo una realizzazione preferita del procedimento (A), come agente sililante nel passaggio (a) viene utilizzato trietilclorosilano, mentre per preparare il derivato 1,14 carbonato nel passaggio (b) viene utilizzato fosgene in toluene in soluzione di cloruro di metilene/piridina 3:1 in atmosfera di azoto. La 14- $\beta$ -idrossi-10-desacetilbaccatina III o V 7-Tes-1,14-carbonato, nel seguente passaggio (c) è salificata con LiHMDS in THF anidro, in modo da ottenere il sale di litio del 10-idrossi derivato, che viene successivamente acetilato con acetilcloruro. La reazione di condensazione tra 14- $\beta$ -idrossi- 7-Tes-1,14-carbonato-baccatina III o V e l'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico (passaggio (d)) è condotta in solvente organico apolare anidro, in presenza di una base e di un

agente di condensazione quale dicicloesilcarbodiimide (DCC).

Infine, nel passaggio (e) il trietilsilile viene eliminato con fluoruro di piridinio in soluzione di acetonitrile/piridina sotto azoto mentre il gruppo dimetossibenzilidenico è eliminato in solvente di metilene cloruro per aggiunta di metanolo HCl e successivamente di  $\text{NaHCO}_3$ .

La sequenza dei passaggi del procedimento appena descritto può essere invertita riuscendo ad ottenere il prodotto finale con rese altrettanto soddisfacenti. Tale procedimento alternativo (B) comprende le seguenti fasi:

- a') acetilazione selettiva dell'idrossile al C-10 della 14 $\beta$ -idrossi-10-desacetilbaccatina III o V;
- b') preparazione del derivato 1,14 carbonato dal prodotto del passaggio (a')
- c') sililazione dell'idrossile in C-7;
- d') reazione del prodotto del passaggio (c') con l'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico;
- e') eliminazione dei gruppi protettori trietilsilile e dimetossibenzilidenico dal prodotto del passaggio (d').

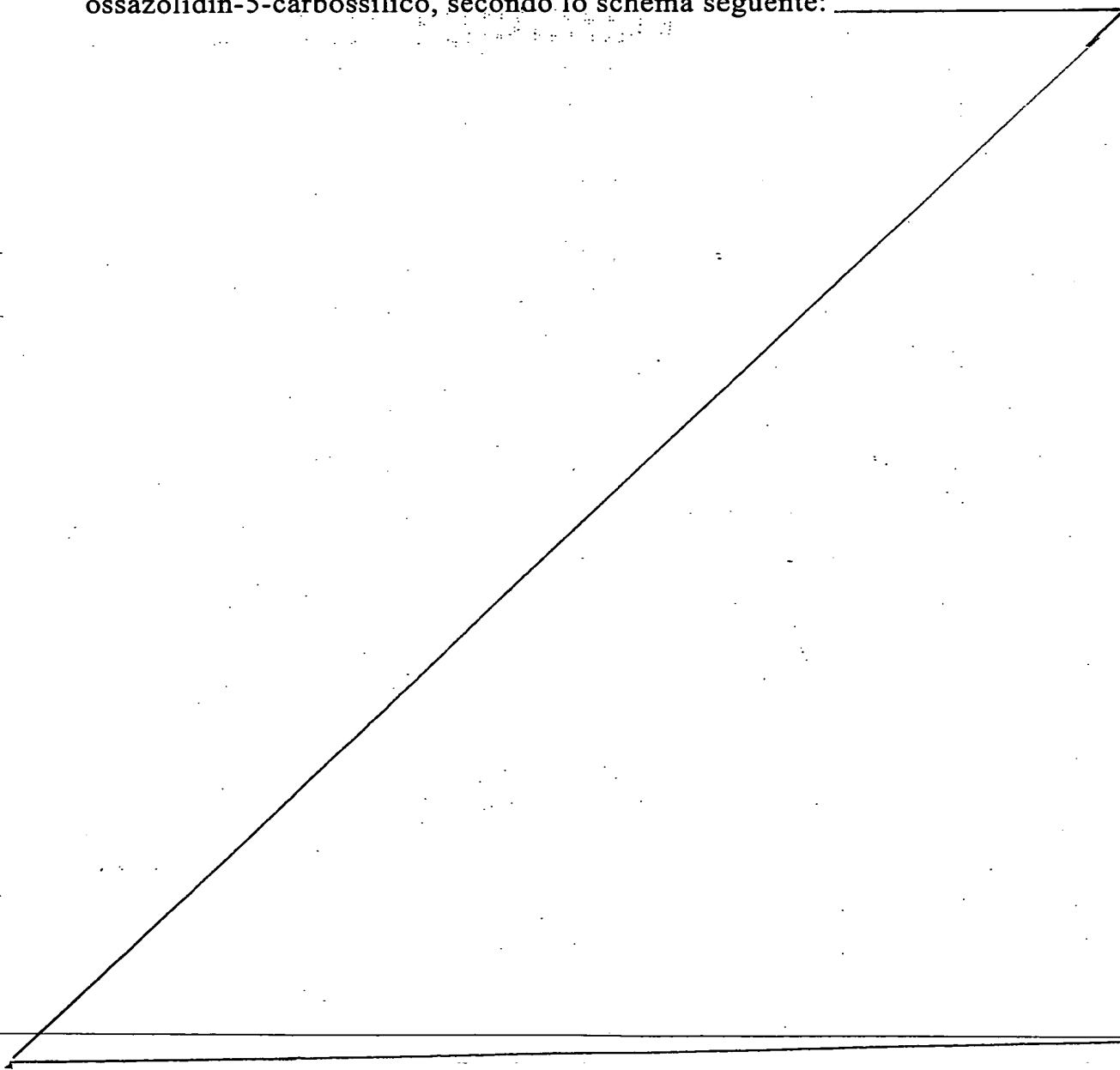
Quest'ultimo procedimento presenta una serie di vantaggi quali la possibilità di ottenere il sintone desiderato (1,14-carbonato-7-Tes-baccatina III o V) senza purificazioni cromatografiche, semplicemente per cristallizzazione.

Secondo una realizzazione preferita, l'acetilazione selettiva del passaggio (a') viene condotta con anidride acetica in presenza di sali di cerio, scandio, itterbio, preferibilmente  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , mentre i rimanenti passaggi vengono condotti come precedentemente indicato.



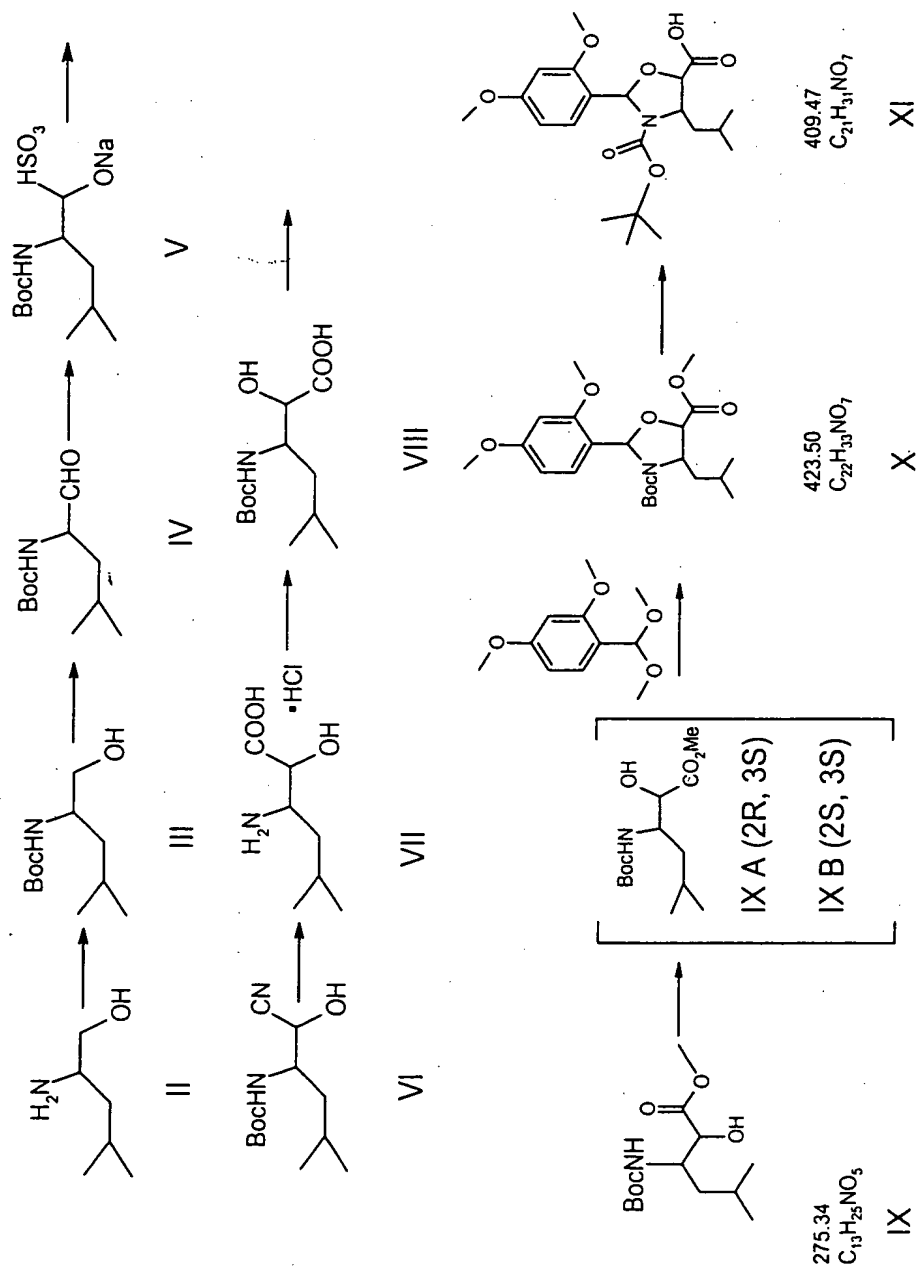
Quali prodotti intermedi del procedimento di preparazione di 14 $\beta$ -idrossi-1,14-carbonato baccatina III o V, devono ritenersi compresi nell'ambito della presente invenzione i seguenti composti: 14 $\beta$ -idrossi baccatina III o V, 14 $\beta$ -idrossi baccatina III o V 1,14 carbonato, 14- $\beta$ -idrossi-7-Tes-10-desacetilbaccatina III o V, 14- $\beta$ -idrossi-7-Tes-baccatina III o V, 14- $\beta$ -idrossi-7-Tes-baccatina III o V 1,14-carbonato.

Un ulteriore aspetto dell'invenzione si riferisce a un procedimento per la preparazione dell'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico, secondo lo schema seguente:





SCHEMA



Tale procedimento comprende le seguenti fasi:

- a) protezione del gruppo amminico del leucinolo con Boc;
- b) trasformazione di N-Boc-L-leucinolo in N-Boc-L-leucinale;
- c) preparazione della cianidrina del prodotto del passaggio (b);
- d) trasformazione del nitrile della cianidrina nell'acido carbossilico corrispondente;
- e) formazione del metil estere dell'acido carbossilico;
- f) purificazione del metil estere dell'acido (2R, 3S)-3-(N-Boc)ammino-2-idrossi-5-metilesanoico;
- g) condensazione del prodotto del passaggio (f) con 2,4-dimetossibenzaldeide dimetil acetale;
- h) trasformazione dell'estere metilico dell'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico nel corrispondente acido carbossilico.

Secondo una realizzazione preferita, nel passaggio (a) il leucinolo viene fatto reagire con Boc-anidride, e successivamente ossidato ad aldeide in solvente DMSO/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> utilizzando cloruro di ossalile ad una temperatura inferiore a -60°C, neutralizzando l'acido che si sviluppa con trietilammina, o ossidandolo con sodio ipoclorito tra -2 e -5°C. La cianidrina del passaggio (c) viene preparata per sostituzione del gruppo solfonico dell'intermedio 1-idrossi-2-(N-Boc)ammino-4-metilpentansolfonato da parte dello ione cianuro. La cianidrina viene poi idrolizzata nel corrispondente acido carbossilico nel passaggio (d) per riscaldamento a refluxo in acido cloridrico concentrato.

Nel passaggio (e), l'acido (2R/S,3S)-3-(N-Boc)ammino-2-idrossi-5-metilesanoico viene convertito nel metil estere corrispondente per reazione

---

con diazometano in soluzione eterea. Nel passaggio (f) il diastereoisomero (2R, 3S) viene purificato per cristallizzazione da cicloesano o miscela esano/toluene. Il passaggio (g) viene condotto in THF in presenza di piridinio p-toluensolfonato eliminando il metanolo che si libera; a reazione completa, il piridinio p-toluensolfonato viene neutralizzato con bicarbonato. Nel passaggio (h), l'estere viene idrolizzato in miscela metanolo/acqua con potassio carbonato. Successivamente, la miscela di reazione viene acidificata e il prodotto finale estratto con metilene cloruro.

In qualità di intermedio per la sintesi di derivati di baccatine III e V sostituite in posizione 13 da un residuo N-Boc- $\beta$ -isobutilserinile, l'invenzione comprende inoltre l'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico.

Il nuovo tassano della presente invenzione ha dimostrato una forte attività antitumorale contro cellule cancerose del seno, del polmone, dell'ovaio e del colon, della prostata, del rene, del pancreas, e anche contro cellule resistenti a noti antitumorali quali adriamicina, vinblastina e derivati del Pt.



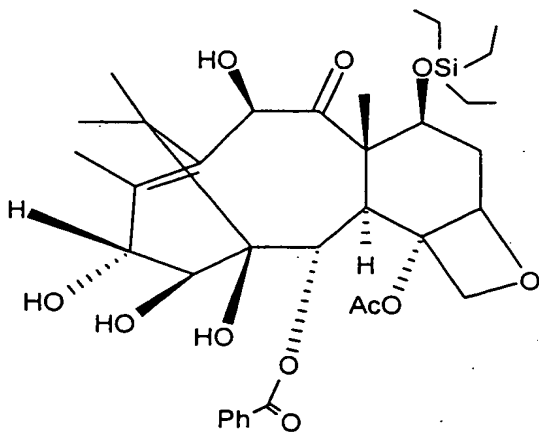
Pertanto, l'invenzione è diretta a formulazioni farmaceutiche contenenti una quantità efficace del composto dell'invenzione, insieme a veicoli ed eccipienti farmacologicamente accettabili. In particolare il composto può essere formulato in forma di compressa, polvere, granulato, capsula, iniettabile, soluzione, supposta, emulsione, dispersione, ed altre. Per la somministrazione intravenosa, vengono principalmente utilizzate miscele di Chremophor L ed etanolo, polisorbato ed etanolo o preparazioni liposomali realizzate con fosfatidilcolina naturale o sintetica, o miscele di fosfolipidi naturali in presenza di colesterolo; per la somministrazione orale, vengono

preferibilmente preparate capsule di gelatina molle in cui il prodotto viene solubilizzato in polisorbati, PEG o miscele di questi, eventualmente in presenza di fosfolipidi. Il composto (I) può essere somministrato all'uomo a concentrazioni comprese fra 50 e 500 mg/m<sup>2</sup>.

Gli esempi sotto riportati illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

**Esempio 1: Sintesi di 13-(N-Boc-β-isobutilserinil)-14β-idrossibaccatina III, 1,14 carbonato**

In un pallone di vetro da 500 ml si sciolgono in 230 ml di DMF 43,26 g di 14β-idrossi-10-desacetilbaccatina III unitamente a 22,3 ml di N-metilimidazolo; sotto energica agitazione a questa soluzione si aggiungono a temperatura ambiente nel periodo di 1h 14 ml di trietilclorosilano. A reazione completa la miscela di reazione si versa in 2L di acqua sotto energica agitazione. Si forma un abbondante precipitato che è lasciato per una notte a 4°C. Il precipitato viene poi filtrato lavandolo accuratamente con acqua e successivamente con n-esano. Si ottengono dopo essiccamento sotto vuoto 48,1 g di 7-Tes-10-desacetilbaccatina III (XII) contenente una piccola percentuale del 7,10-derivato, avente le seguenti caratteristiche chimico-fisiche:



(XII)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  (ppm) = 0,55 (6H, t,  $J = 7,8$  Hz, 7-OTES  $\text{CH}_2$ ), 0,94 (9H, q,  $J = 7,8$  Hz, 7-OTES  $\text{CH}_3$ ), 1,18 (3H, s,  $\text{C16H}_3$ ), 1,20 (3H, s,  $\text{C17H}_3$ ), 1,77 (3H, s,  $\text{C19H}_3$ ), 1,90 (1H, ddd,  $J = 2,4, 10,8, 13,2$  Hz,  $\text{C6H}\beta$ ), 2,12 (3H, d,  $J = 1,6$  Hz,  $\text{C18H}_3$ ), 2,31 (3H, s, 4-OCOCH $_3$ ), 2,48 (3H, ddd,  $J = 14,3, 9,8, 6,5$  Hz,  $\text{C6H}\alpha$ ), 2,73 (1H, d,  $J = 5,5$  Hz, OH) 3,79 (1H, d,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{C3H}$ ), 4,20 (1H, dd,  $J = 1,0, 8,3$  Hz,  $\text{C20H}\beta$ ), 4,31 (1H, d,  $J = 8,6$  Hz,  $\text{C20H}\alpha$ ), 4,39 (1H, dd,  $J = 6,4, 10,7$  Hz,  $\text{C7H}$ ), 4,77 (1H, d,  $J = 5,8$  Hz,  $\text{C14H}$ ), 4,94 (1H, dd,  $J = 2,1, 9,7$  Hz,  $\text{C5H}$ ), 5,05 (1H, m,  $\text{C13H}$ ), 5,13 (1H, d,  $J = 1,9$  Hz,  $\text{C10H}$ ), 6,05 (1H, d,  $J = 7,3$  Hz,  $\text{C2H}$ ), 7,41-8,09 (5H, m, Ph).

Spettro di Massa ( $\text{NH}_3$ , DEP/CI, ioni positivi): ( $m/z$ ) 718 [ $(\text{M}+\text{NH}_4)^+$ , 100%], 701 [ $\text{M}+\text{H}^+$ , 39%].

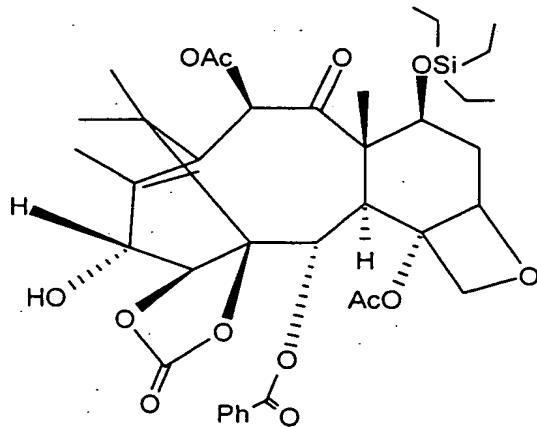
Il composto ottenuto viene disciolto in 300 ml di una miscela di cloruro di metilene/piridina 3:1 in atmosfera di azoto; questa soluzione viene aggiunta sotto agitazione ad una soluzione di fosgene (214 ml di una soluzione 1,9M in toluene) preraffreddata a  $-10^\circ\text{C}$ , mantenendo la temperatura durante l'aggiunta fra  $-5$  e  $-10^\circ\text{C}$ .

La miscela di reazione viene mantenuta sotto agitazione per 30', quindi sbattuta con 700 ml di soluzione satura di  $\text{NaHCO}_3$  controllando la temperatura che non deve superare  $2^\circ\text{C}$ . Si separano le fasi e la fase organica viene lavata fino all'eliminazione della piridina.

La fase organica è disidratata su  $\text{MgSO}_4$  e concentrata a secco. Si ottengono 46,6 g di 7-Tes-1,14-carbonato della 10-desacetilbaccatina III che può essere usato come tale per le reazioni seguenti.

31 g del composto vengono solubilizzati in 250 ml di THF rigorosamente anidro; la soluzione è raffreddata a  $-50^\circ\text{C}$  e addizionata di 48 ml di una

soluzione 1M di LiHMDS in un tempo di 2 minuti e lasciata sotto agitazione per 20 minuti alla stessa temperatura. Sotto agitazione si aggiungono 3,47 g di acetilcloruro in un tempo di 40 minuti. La temperatura di reazione è lasciata salire fino a 0°C e sotto agitazione per 2h. A fine reazione la miscela di reazione è trattata con una soluzione satura di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e diluita con etile acetato. Si separano le fasi e la soluzione acquosa è controestratta con etile acetato fino all'esaurimento del prodotto. Le fasi organiche riunite sono lavate con acqua e quindi essiccate su  $\text{MgSO}_4$  e concentrate a secco. Si ottengono 33 g di 14 $\beta$ -idrossi-7-Tes-1,14-carbonato-baccatina III impuro di composti delle precedenti reazioni. Questo composto è cromatografato su gel di silice eluendo il prodotto puro con una miscela di etile acetato/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  9:1. Si ottengono 30 g del prodotto desiderato (XIII) avente le caratteristiche seguenti:



(XIII)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$  (ppm) = 0,55 (6H, t,  $J$  = 7,8 Hz, 7-OTES  $\text{CH}_2$ ), 0,95 (9H, q,  $J$  = 7,8 Hz, 7-OTES  $\text{CH}_3$ ), 1,16 (3H, s,  $\text{C}_{16}\text{H}_3$ ), 1,32 (3H, s,  $\text{C}_{17}\text{H}_3$ ), 1,77 (3H, s,  $\text{C}_{19}\text{H}_3$ ), 1,88 (1H, ddd,  $J$  = 2,4, 10,8, 13,2 Hz,  $\text{C}_6\text{H}\beta$ ),

2,21 (3H, d,  $J = 1,6$  Hz, C18H<sub>3</sub>), 2,19 (3H, s, 10-OCOCH<sub>3</sub>), 2,31 (3H, s, 4-OCOCH<sub>3</sub>), 2,48 (3H, ddd,  $J = 14,3, 9,8, 6,5$  Hz, C6H $\alpha$ ), 2,73 (1H, d,  $J = 5,5$  Hz, OH) 3,72 (1H, d,  $J = 7,1$  Hz, C3H), 4,20 (1H, d,  $J = 8,3$  Hz, C20H $\beta$ ), 4,31 (1H, d,  $J = 8,6$  Hz, C20H $\alpha$ ), 4,46 (1H, dd,  $J = 6,4, 10,7$  Hz, C7H), 4,79 (1H, d,  $J = 5,8$  Hz, C14H), 4,94 (1H, dd,  $J = 2,1, 9,7$  Hz, (C5H), 5,02 (1H, m, C10H), 5,05 (1H, m, C13H), 6,09 (1H, d,  $J = 7,3$  Hz, C2H), 7,41-8,09 (5H, m, Ph).

Spettro di Massa (NH<sub>3</sub>, DEP/CI, ioni positivi): ( $m/z$ ) 759 [(M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, 19%], 743 [M+H]<sup>+</sup>, 100%].

In un pallone da 1L si pongono 20 g di 14 $\beta$ -idrossi-7-Tes-1,14-carbonato-baccatina III insieme a 300 ml di toluene rigorosamente anidro; si aggiungono sciolti in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10 g dell'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-oxazolidine-5-carbossilico e 2 g di N,N-dimetilamminopiridina (DMAP) e 9,5 g di dicicloesilcarbodiimmide (DCC). La miscela di reazione è riscaldata a riflusso per 3h. Si elimina dopo raffreddamento della reazione il prodotto ureico che precipita e le acque madri sono lavate con soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> per l'eliminazione dell'acido non reagito quindi con acido cloridrico diluito per eliminare DMAP e poi ancora con NaHCO<sub>3</sub> fino a neutralità. Si ottengono dopo concentrazione a secco della fase organica 41,5 g di prodotto che può essere usato come tale nella fase successiva.



40 g di questo composto vengono deprotetti in due passaggi per eliminazione del Tes prima e del 2,4-dimetossibenzaldeide dopo. 40 g del composto sono sciolti in 100 ml di una miscela acetonitrile/piridina (80:100) sotto azoto ed il tutto raffreddato a 0°C; si aggiungono 13 ml di fluoruro di piridinio e il tutto è lasciato sotto agitazione per 24 h. La soluzione è versata in 2L di acqua ed il prodotto filtrato ed essiccato sotto vuoto.

Il residuo viene sciolto in 60 ml di metilene cloruro ed a questa soluzione sotto forte agitazione e a 0°C si aggiungono 40 ml di Metanolo HCl 0,6N. La miscela di reazione è lasciata per 2h sotto agitazione, quindi diluita con 150 ml di metilene cloruro e sbattuta con una soluzione di NaHCO<sub>3</sub> aggiustando il pH fra 6-7. La fase organica è concentrata a secco ed il residuo cristallizzato da acetone esano. Si ottengono dopo essiccamento 16 g di 13-(N-Boc-β-isobutylisoserinil)-14β-idrossibaccatina-1,14-carbonato avente le seguenti caratteristiche fisico-chimiche e spettroscopiche:

**Formula:** C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>NO<sub>17</sub>

**Aspetto:** polvere bianca.

**Punto di fusione:** 245°C

**Tabella 1: Spostamenti chimici (ppm) <sup>1</sup>H NMR in soluzione di CDCl<sub>3</sub> (200 MHz)**

H	Ppm, molteplicità (Hz)	H	Ppm, molteplicità (Hz)
2	6,09-d (7,8)	2'	4,30-dd (6,4; 3,2)
3	3,68-d (7,4)	3'	4,08-m
5	4,91-dd (9,7; 2,5)	4'a	1,21-m
6α	2,52-ddd (14,8; 9,8; 6,9)	4'b	1,43-m
6β	1,86-m	5'	1,65-m
7	4,37-m	6'	0,96-d (6,3)
10	6,25-s	7'	0,95-d (6,3)
13	6,44-d (ampio, 6,9)	4-OCOCH <sub>3</sub>	2,40-s
14	4,84-d (6,9)	10-OCOCH <sub>3</sub>	2,22-s
16	1,25-s	Boc	1,35-s
17	1,32-s	o-benzoile	8,01-m
18	1,87-d (1,6)	m-benzoile	7,46-m
19	1,69-s	p-benzoile	7,58-m
20α	4,27-d (8,4)	3'-NH	4,72-d (9,0)
20β	4,20-d (8,4)		



**Tabella 2: Spostamenti chimici (ppm)  $^{13}\text{C}$  NMR in soluzione di  $\text{CDCl}_3$  (50,308 MHz)**

C	ppm, molteplicità	C	ppm, molteplicità
9	201,8-s	8	58,2-s
1'	172,6-s	3'	51,2-d
4- $\text{OCOCH}_3$	170,5-s	3	44,6-d
10- $\text{OCOCH}_3$	170,2-s	15	41,3-s
2- $\text{COPh}$	164,3-s	4'	39,9-t
$\text{C=O}$ (Boc)	155,8-s	6	34,9-t
$\text{C=O}$ (carbonato)	151,4-s	$(\text{CH}_3)_3\text{C Boc}$	27,7-q
12	139,4-s	17	25,5-q
11	133,1-s	16	22,6-q
$(\text{Me})_3\text{C(Boc)}$	80,0-s	4- $\text{OCOCH}_3$	22,0-q
5	83,8-d	10- $\text{OCOCH}_3$	20,2-q
1	87,7-s	5'	24,3-d
4	80,0-s	6'	22,7-q
2	69,0-d	7'	21,6-q
20	75,5-t	18	14,6-q
2'	73,3-d	19	9,8-q
7	71,2-d	q-benzoile	127,5-s
10	74,3-d	o-benzoile	129,5-d
13	74,1-d	m-benzoile	128,6-d
14	79,1-d	p-benzoile	133,7-d

**Spettri di massa:** ( $\text{NH}_3$ , DEP/CI, ioni positivi): ( $m/z$ ) 889  $[(\text{MNH}_4)^+]$ , 832  $[(\text{MNH}_4-(\text{CH}_3)_3\text{C})^+]$ , 772  $[(\text{MNH}_4-\text{BocNH}_2)^+]$

( $\text{NH}_3$ , DEP/CI, ioni negativi): ( $m/z$ ) 871 ( $\text{M}^-$ ), 260 (catena laterale)

**Spettro infrarosso (disco KBr):** 3521, 3321, 2971, 2953, 1826, 1762, 1706, 1526, 1366, 1238, 1165, 1072, 723  $\text{cm}^{-1}$

**Spettro UV (MeOH):** 231, 276 e 284 nm;

-E<sub>1%</sub> a 231 nm = 180,99

-E<sub>1%</sub> a 276 nm = 14,094

-E<sub>1%</sub> a 284 nm = 12,182

**Esempio 2: Sintesi di 13-(N-Boc-β-isobutilserinil)-14β-idrossibaccatina V, 1,14 carbonato**

5 g di 13-(N-Boc-β-isobutilserinil)-14β-idrossibaccatina III, 1,14 carbonato vengono sciolti in 500 ml di toluene in atmosfera di argon deossigenando completamente la soluzione; si aggiungono 80 mg di DBU (diazabicyclo[5,4,0]7-undecene) e la miscela di reazione in atmosfera di argon è riscaldata a ricadere per 1 ora. La soluzione è diluita con 100 ml di etile acetato e lavata con acqua. La fase organica è evaporata a secco ottenendo 4,5 g di 13-(N-Boc-β-isobutilserinil)-14β-idrossibaccatina V, 1,14 carbonato avente le seguenti caratteristiche chimico-fisiche e spettroscopiche:

**Formula:** C<sub>44</sub>H<sub>57</sub>NO<sub>17</sub>

**Aspetto:** polvere bianca

**Punto di fusione:** 245°C

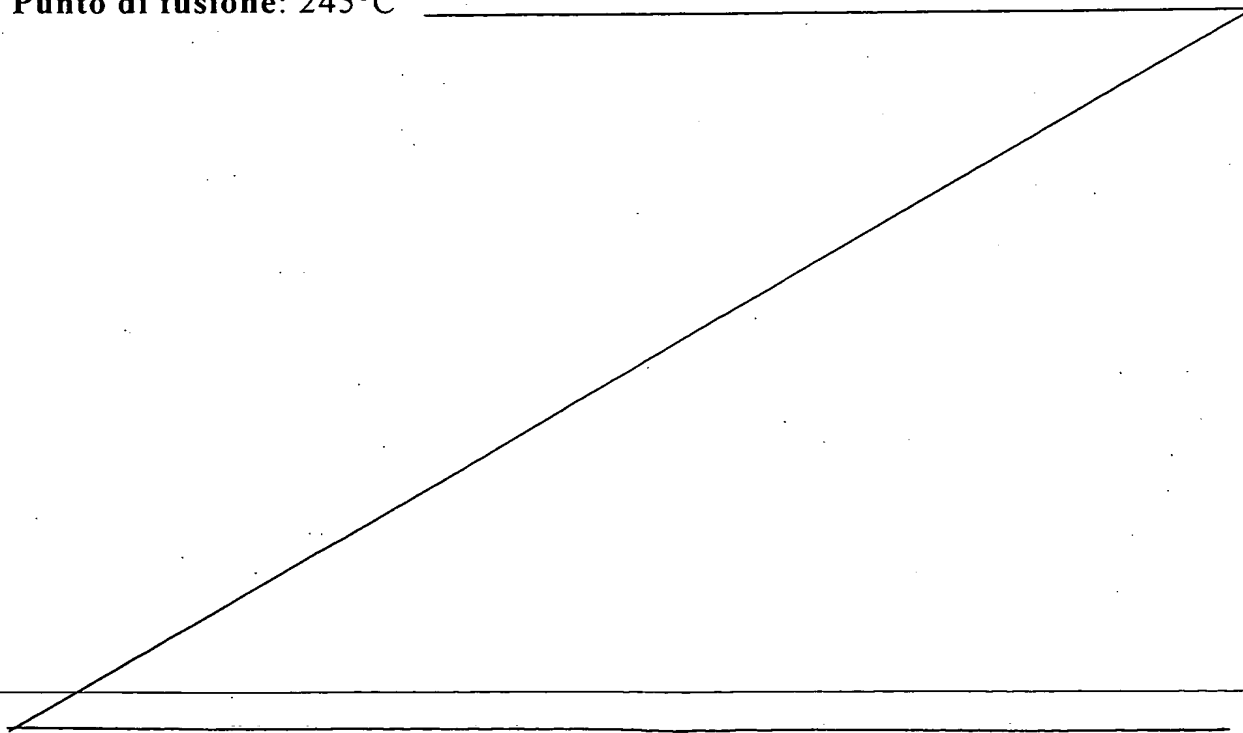


Tabella 3: Spostamento chimico (ppm)  $^1\text{H}$  NMR in soluzione di  $\text{CDCl}_3$  (200 MHz)

H	Ppm, molteplicità (Hz)	H	Ppm, molteplicità (Hz)
2	6,18 – d (7,9)	2'*	4,75 – d (8,6)
3	3,80 – d (7,8)	3'	4,01 – m
5	4,93 – dd (7,8, 4,8)	4'a	1,25 – m
6	2,23 – m	4'b	1,48 – m
7	3,76 – m	5'	1,67 – m
10	6,79 – s	6'	0,99 – d (6,4)
13	6,44 – d (6,7)	7'	0,97 – d (6,4)
14	4,88 – d (7,0)	4-OCOCH <sub>3</sub>	2,58 – s
16	1,29 – s	10-OCOCH <sub>3</sub>	2,20 – s
17	1,31 – s	Boc	1,37 – s
18	1,87 – d (1,5)	o-benzoile	8,06 – m
19	1,71 – s	m-benzoile	7,49 – m
20	4,38 – s	p-benzoile	7,61 – m
		3'-NH*	4,60 – d (11,2)

\* Può essere invertito



**Tabella 4: Spostamento chimico (ppm)  $^{13}\text{C}$  NMR in soluzione di  $\text{CDCl}_3$   
(50,308 MHz)**

C	Ppm, molteplicità	C	Ppm, molteplicità
9	206,1 – s	8	58,2 – s
1'	173,1 – s	3'	52,0 – d
4-O <u>C</u> OCH <sub>3</sub>	172,7 – s	3	40,4 – d
10-O <u>C</u> OCH <sub>3</sub>	169,3 – s	15	41,5 – s
2- <u>C</u> OPh	165,1 – s	4'	40,6 – t
<u>C</u> =O(Boc)	156,6 – s	6	35,2 – t
<u>C</u> =O(Carbonato)	152,1 – s	( <u>C</u> H <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C (Boc)	28,4 – q
12	137,6 – s	17	25,4 – q
11	134,0 – s	16	22,4 – q
(Me) <sub>3</sub> <u>C</u> (Boc) <sup>§</sup>	81,7 – s	4-OCO <u>C</u> H <sub>3</sub>	22,7 – q
5	82,7 – d	10-OCO <u>C</u> H <sub>3</sub>	18,6 – q
1	88,5 – s	5'	25,1 – d
4 <sup>§</sup>	80,7 – s	6'	23,4 – q
2	69,9 – d	7'	20,9 – q
20	77,2 – t	18 <sup>^</sup>	15,2 – q
2 <sup>°</sup>	74,6 – d	19 <sup>^</sup>	16,2 – q
7 <sup>°</sup>	77,6 – d	q-benzoile	128,3 – s
10 <sup>°</sup>	74,2 – d	o-benzoile	130,2 – d
13 <sup>°</sup>	76,0 – d	m-benzoile	128,2 – d
14	79,9 – d	p-benzoile	134,4 – d

\*, §, °, ^ = Può essere invertito

**Spettro di massa (TSP+):** ( $m/z$ ) 872 ( $\text{MH}^+$ ); 816 ( $\text{MH}^+ - (\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CH}_2$ ); 772  
(816- $\text{CO}_2$ ); 756 (816-AcOH); 712 (772-AcOH)

**Spettro infrarosso (KBr disc):** 3450, 2963, 1813, 1740, 1702, 1247, 1091, 710  
 $\text{cm}^{-1}$

**Spettro UV (MeOH):** 200 e 230 nm

-E<sub>1%</sub> a 200 nm = 370,9

-E<sub>1%</sub> a 230 nm = 193,2

**Esempio 3: Preparazione dell'acido (4S, 5R)-N-Boc-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico**

**Preparazione di N-Boc-L-leucinolo (III):**

46,8 g di L-leucinolo II (400 mmol) vengono sciolti in 300 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in un pallone da 2 litri con tre colli dotato di agitatore meccanico, termometro e imbuto gocciolatore. Alla soluzione sotto agitazione è stata quindi aggiunta a temperatura ambiente la soluzione di anidride di Boc (87,2 g, 400 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) per gocciolamento in un periodo di 90 minuti. Durante l'aggiunta del primo 25% della Boc-anidride, la reazione è esotermica e raggiunge i 20-30°C dando luogo a una spessa poltiglia che dopo agitazione a temperatura ambiente per altre tre ore diventa limpida. Il tutto è lasciato a temperatura ambiente per una notte. Il solvente è stato evaporato in alto vuoto per ottenere il prodotto desiderato in una resa quantitativa (87 g) come olio viscoso. Il prodotto è stato successivamente trattato senza ulteriore purificazione.

**Preparazione di N-Boc-L-leucinale (IV)**

Ad una soluzione di cloruro di ossalile (26,274 mL, 300 mmol) in 130 ml di cloruro di metilene preraffreddato a -60/-65°C si è aggiunto lentamente DMSO (28,4 mL, 400 mmol).

La soluzione è divenuta limpida dopo aggiunta completa di DMSO. Dopo 20 minuti di agitazione alla temperatura di cui sopra la miscela di reazione è stata successivamente trattata con una soluzione dell'alcol III (43,7 g, 200 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 mL) per un periodo di 25 min. mantenendo la

temperatura al di sotto dei  $-60^{\circ}\text{C}$ . Durante l'aggiunta dell'alcol la miscela di reazione diventa opaca, e si forma un precipitato bianco. Dopo 20-25 minuti di agitazione alla temperatura precedente è stata aggiunta gocciolando una soluzione di trietilammina (112 mL, 800 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) in un periodo di 40 minuti mantenendo la temperatura tra  $-68$  e  $-62^{\circ}\text{C}$ . La miscela di reazione è stata quindi mantenuta in agitazione tra  $-60$  e  $-65^{\circ}\text{C}$  per ulteriori 50 minuti. La TLC della miscela di reazione condotta usando metanolo all'8% in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  come eluente non ha evidenziato prodotto di partenza.

La soluzione fredda è stata quindi versata in 800 ml di una soluzione ghiacciata contenente 68g (0,5 mol) di  $\text{KHSO}_4$ . Lo strato organico è stato separato e lo strato acquoso estratto con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL). Gli strati organici combinati sono stati lavati con  $\text{KHSO}_4$  acquoso (5%, 1x200 mL), salamoia (100 mL, 50 mL) e concentrati fino a metà del volume ( $\sim 250$  mL). Tale materiale è stato usato direttamente nel passaggio successivo.

#### Derivato del composto bisolfítico dell'aldeide (V)

La soluzione di cloruro di metilene dell'aldeide (IV) viene trattata in un tempo di 10 minuti e a  $-5^{\circ}\text{C}$  con una soluzione di sodio bisolfito (41,7 g, 400 mmol) in acqua (200 mL) e successivamente  $n\text{-Bu}_4\text{NHSO}_4$  (678 mg, 2 mmol) in un pallone da due litri a tre colli dotato di agitatore meccanico, termometro e imbuto gocciolatore. La soluzione è stata raffreddata a  $-5^{\circ}\text{C}$ . La miscela di reazione è stata agitata tra  $-5$  e  $0^{\circ}\text{C}$  per 5-6 ore e successivamente per una notte a temperatura ambiente. Lo strato acquoso contenente il composto V è stato separato e lavato con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 20 mL).

#### (2-Ciano-3-(N-Boc)-ammino-5-metil-esanolo (VI)

Alla soluzione acquosa di cui sopra ( $\sim 250$  mL) è stato aggiunto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

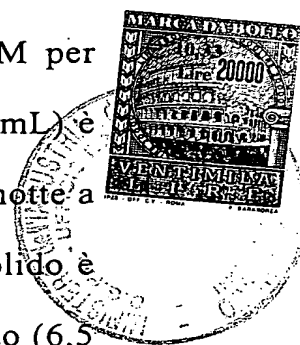
(120 mL) e la miscela di reazione raffreddata a 0-5°C in un bagno di ghiaccio. KCN solido (15 g, 230 mmol) è stato successivamente aggiunto alla miscela di reazione e la soluzione agitata a temperatura ambiente per una notte. Lo strato organico è stato separato e lo strato acquoso estratto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Gli strati organici combinati sono stati lavati con salamoia (1x50 mL), essiccati su MgSO<sub>4</sub> ed evaporati per ottenere il prodotto come liquido viscoso incolore (43 g). Il prodotto aveva  $[\alpha]_D$  di -51,11 (c=2, MeOH) ed era una miscela di circa 2:1 dei derivati di 5 2(R),3(S) e 2(S),3(S). La resa era dell'89% rispetto all'L-leucinolo di partenza.

Acido (2RS,3S)-3-ammino-2-idrossi-5metilesanoico (VII)

La miscela del precedente nitrile VI grezzo (43 g) viene trattata con 150 ml di HCl concentrato (37%) (150 mL) e riscaldata a riflusso per una notte a dare l'acido grezzo VII\*. L'acido cloridrico in eccesso è stato eliminato su rotavapor e il residuo evaporato con acqua (100 mL) per eliminare HCl. Il residuo è stato quindi disciolto in 150 ml di acqua e addizionato di 100 ml di acetone e quindi trattato con 33 ml di una soluzione di NaOH 6,25 M per portare il pH della soluzione a 5. Un'ulteriore aliquota di acetone (500 mL) è stata quindi aggiunta alla soluzione che è stata lasciata a riposo per una notte a 4°C. Il solido precipitato è stato successivamente filtrato e il pannello solido è stato lavato con acetone ed essiccato sotto vuoto a dare l'acido VII grezzo (6,5 g) che conteneva circa una miscela 3:1 dei derivati 2(R),3(S) e 2(S),3(S) di 6.

Il filtrato è stato evaporato e si è aggiunta acqua per portare il volume della soluzione a 75 mL.

Si è quindi aggiunto acetone (1 L) alla soluzione che è stata lasciata a riposo per una notte a 4°C in frigorifero. Il solido precipitato è stato quindi



filtrato e il pannello solido è stato lavato con acetone ed essiccato sotto vuoto a dare una seconda quantità di prodotto (18 g) contenente NaCl solido con una miscela di circa 1:1 dei derivati 2(R),3(S) e 2(S),3(S) di VII.

Il primo prodotto VII isolato (22,5 g) è stato scaldato in acqua (120 mL) senza ottenere una soluzione completa e quindi raffreddato in ghiaccio e filtrato ottenendo 12,5 g dell'acido VII ancora contaminato da circa il 10% del derivato 2(R),3(S) di VII non desiderato. Questo prodotto viene essiccato e miscelato con la miscela 1:1 precedente del secondo blocco di cristalli (totale ~27 g).

Acido (2RS,3S)-3-(N-Boc)ammino-2-idrossi-5-metilesanoico (VIII)

(A) L'acido 6 grezzo 2(R),3(S) di circa il 90% di purezza (2,5 g, 7,76 mmol) è stato sciolto in una miscela acqua – THF 1:1 (80 mL) e quindi è stata aggiunta trietilammina (13,5 mL) alla miscela di reazione e successivamente Boc anidride (18,5 g, 85 mmol), l'intera soluzione è stata agitata per 40 ore a temperatura ambiente. Il solvente è stato evaporato in rotavapor, si sono aggiunti 60 ml di acqua e 60 ml di etil acetato mantenendo il tutto sotto agitazione. Lo strato acquoso è stato separato ed estratto con etil acetato (30 mL). Le fasi organiche combinate sono state estratte con sodio carbonato acquoso al 10% (30 mL, 20 mL). L'estratto basico è stato quindi combinato con uno strato acquoso acidificato con acido cloridrico 2M (~55 mL) fino ad un pH della soluzione di 2. L'acido VIII è stato quindi estratto dallo strato acquoso con etil acetato (3x40 mL) e gli estratti eteroacetici lavati con acqua (20 mL), essiccati ( $\text{MgSO}_4$ ) ed evaporati a dare il Boc derivato di VIII grezzo come sciroppo (20 g, 99%).

(B) L'acido VII grezzo 2R,3S con purezza di circa il 50% contaminato da

---



NaCl (27 g) è stato sciolto in una miscela acqua – diossano 1:1 (120 mL). Si è quindi aggiunta trietilammina (20 mL) alla miscela di reazione e in seguito anidride Boc (26,16 g, 120 mmol). L'intera soluzione è stata agitata mantenendo l'agitazione per 40 ore a temperatura ambiente. Il solvente è stato evaporato in rotavapor e si è aggiunta acqua (100 mL) ed etil acetato (100 mL) al residuo mantenendo l'agitazione per ulteriori pochi minuti. Lo strato organico è stato separato ed estratto con carbonato di sodio acquoso al 10% (45 mL, 30 mL). Gli estratti di sodio carbonato sono stati quindi combinati con lo strato acquoso, acidificati con acido cloridrico 1M (~165 mL) ed estratti con etil acetato (3x60 mL). Si è quindi lavato con acqua (30 mL), essiccato ( $\text{MgSO}_4$ ) ed evaporato a dare il derivato Boc di 7 grezzo come sciroppo (16 g), consistente di una miscela 1:1 degli isomeri e 2R,3S e 2S,3S.

Metil estere dell'acido (2R,3S)-3-(N-Boc)ammino-2-idrossi-5-metilesanoico (IX)

Il diazometano è stato preparato da diazald seguendo il procedimento riportato in T.H. Black [Aldrichimica Acta, 16, 3 (1983)].

(A) Si è aggiunta una soluzione dell'acido grezzo VIII (20 g, 56,6 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (75 mL) lentamente in una soluzione eterea di diazometano fredda (~77 mmol) e la miscela è stata lasciata per due ore in un bagno di ghiaccio. Il colore della soluzione in quella fase è diventato bianco indicando che la maggior parte del diazometano era stato consumato. La soluzione è stata quindi concentrata e il residuo cristallizzato da una miscela di toluene (20 mL) ed esano (70 mL). Dopo raffreddamento per una notte in frigorifero a 4°C i cristalli del derivato IXA 2R,3S puro sono stati raccolti per filtrazione. La resa è stata di 15 g. Le acque madri hanno dato circa 5 g di una miscela 1:1 degli

isomeri.

(B) Usando la stessa tecnica è stata convertita una miscela 1:1 dell'acido VIII (16 g) in una miscela 1:1 degli esteri di IXA e IXB. Il materiale delle acque madri (5 g dall'esperimento A) è stato aggiunto e il materiale combinato e separato per cromatografia in colonna usando esano-etil acetato come eluente (da 9:1 a 7:3). Si è usata ninidrina per sviluppare le piastre TLC. Il composto non polare,  $R_f$  0,75 (esano-etil acetato : 7:3) è stato identificato come l'estere ricercato IXA (2R,3S). E' stato ricristallizzato da cicloesano a dare IXA in forma di aghi incolori (8 g) p.s. 95-96°C,  $[\alpha]_D -72,4^\circ$  (c=1, MeOH).

Il composto polare  $R_f$  0,5 (esano-etil acetato 7:3) è stato identificato come IXB (2S,3S). E' stato ricristallizzato da cicloesano a dare 10g di IXB come aghi incolori.

#### Dimetil acetale di 2,4-dimetossibenzaldeide

Una miscela di 2,4-dimetossibenzaldeide (41,25 g, 0,25 moli), trimetil ortoformiato anidro (50 mL) e ammonio nitrato (2 g sciolti in 20 mL di metanolo) è stata scaldata a riflusso per 6 ore ( $^1\text{HNMR}$  della miscela di reazione ha mostrato una conversione del 65-70%). All'inizio la miscela di reazione calda era una soluzione limpida, mentre con l'avanzamento della reazione iniziò a precipitare il solido. E' stata aggiunta una seconda porzione di trimetil ortoformiato anidro (20 mL) e parte del metanolo è stato eliminato per distillazione.

Quando la temperatura della miscela di reazione è arrivata a 95-100°C tutto il solido si è sciolto nel pallone. Si è raffreddato a temperatura ambiente e si è aggiunta  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidra (5 g), e si è mantenuta l'agitazione per 30 min. Successivamente la soluzione è stata filtrata e il residuo è stato distillato per

distillazione frazionata sotto vuoto a 0,25 mm di Hg. La prima frazione a bassa temperatura consisteva principalmente nell'eccesso di trimetil ortoformiato e la seconda frazione distillata come olio incolore a 175-180°C era l'acetale ricercato. Resa: 37 g (70%).

Estere metilico dell'acido (4S,5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico (X)

A una soluzione del metil estere dell'acido (2R, 3S)-3-(N-Boc)ammino-2-idrossi-5-metilesanoico (IXA) (34,375 g, 125 mmol) in THF anidro (150 ml) è stata aggiunta 2,4-dimetossibenzaldeide dimetil acetale distillata (30 g, 142 mmol) e in seguito piridinio p-toluensolfonato (Py.Tos; 400 mg).

La soluzione è stata riscaldata con leggero riflusso in un pallone a tre colli da 500 ml dotato di un condensatore a riflusso con adattatore Dean-Stark. Dopo circa 6 ore a riflusso, sono stati eliminati circa 60 ml di THF contenente metanolo generato durante la reazione. E' stato prelevato un campione per l'analisi  $^1\text{H}$  NMR (in  $\text{CDCl}_3$ ). Il picco a  $\delta = 1,41$  ppm scompare (1) e un nuovo picco compare a  $\delta = 1,24$  ppm per il metilestere protetto (2). Dopo 6 ore di riscaldamento a riflusso, la conversione è di circa 70-75%.



Si è aggiunta un'aliquota fresca di THF anidro (50 ml) e in seguito una quantità aggiuntiva di 2,4-dimetossibenzaldeide acetale (5,0 g; 24 mmol). La miscela di reazione è stata riscaldata a riflusso per ulteriori 2,5 ore, durante le quali sono stati eliminati circa 50 ml di THF usando l'assemblaggio Dean-Stark. La successiva analisi  $^1\text{H}$  NMR ha mostrato la completa trasformazione del materiale di partenza.

Alla miscela di reazione è stata aggiunta una soluzione acquosa satura di  $\text{NaHCO}_3$  (15 ml) e la miscela è stata agitata per 15 minuti per neutralizzare il

Py.Tos. Successivamente sono stati aggiunti t-butil metil etere (85 ml) e acqua (15 ml) ed è stata separata la fase organica. La fase acquosa è stata estratta con t-butil metil etere (20 ml) e le fasi organiche combinate sono state lavate con acqua (30 ml) ed evaporate lasciando un residuo (66 g) di prodotto grezzo X.

#### Idrolisi dell'estere X a dare l'acido XI

L'estere X grezzo (22 g, 42 mmol) è stato sciolto in 100 ml di metanolo ed è stata aggiunta acqua (50 ml) contenente 8,7 g di carbonato di potassio. Dopo agitazione per una notte a temperatura ambiente, la reazione è stata giudicata completa per monitoraggio con TLC (toluene-etilacetato: 4,5:1). L'analisi TLC è stata confermata con analisi  $^1\text{H}$  NMR, controllando la scomparsa del picco del metilestere.

Il metanolo è stato evaporato ad una temperatura non superiore a 40°C sotto vuoto (residuo circa 60 g) ed è stata aggiunta acqua (150 ml) al residuo. La sospensione acquosa è stata estratta con etilacetato (5x50 ml) per eliminare l'eccesso di benzaldeide e benzaldeide dimetil acetale. Sono stati aggiunti 90 ml di cloruro di metilene alla fase acquosa, la miscela è stata raffreddata in bagno di ghiaccio e il sistema bifasico è stato trattato con circa 125 ml di  $\text{NaHSO}_4$  1 M (pH = 3) sotto vigorosa agitazione. Dopo aver separato le fasi lo strato acquoso è stato estratto con cloruro di metilene (75 ml). Gli estratti combinati di cloruro di metilene sono stati lavati con acqua (30 ml), salamoia (30 ml) ed essiccati su  $\text{MgSO}_4$ . La soluzione è stata quindi conservata a -60°C fino a nuovo uso. La resa del prodotto finale come solido incolore è stata di 16 g, circa 93% basata sul prodotto iniziale.

#### Esempio 4: Preparazione del 14β-idrossi-7-Tes baccatina III 1,4 carbonato

A una soluzione di 11,2 g di 10-desacetil-14-idrossibaccatina III in 50

---

ml di tetraidrofurano anidro si aggiungono 0,72 g di  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 7,3 ml di anidride acetica. La miscela di reazione si mantiene sotto agitazione a temperatura ambiente per 5 ore; durante questo tempo la miscela di reazione diventa omogenea. Si aggiungono 10 g di ghiaccio e il tutto si mantiene sotto agitazione per 1 ora. Si evapora il tetraidrofurano sotto vuoto e il residuo si diluisce con 200 ml di  $\text{H}_2\text{O}$ . si filtra il precipitato che si essicca sotto vuoto in presenza di  $\text{P}_2\text{O}_5$ ; il prodotto si cristallizza da etile acetato ottenendo 10 g di 14-idrossibaccatina III avente le seguenti caratteristiche:

Mp:  $236-8^\circ\text{C}$ ; IR (KBr): 3474, 1739, 1400, 1240, 1090,  $1049\text{ cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz); 8,07 (d,  $J = 8\text{ Hz}$ , Bz), 7,55 (d,  $J = 8\text{ Hz}$ , Bz), 7,44 (t,  $J = 8\text{ Hz}$ , Bz), 6,31 (s, H-10), 5,80 (d,  $J = 7\text{ Hz}$ , H-2), 4,97 (br d,  $J = 8\text{ Hz}$ , H-5), 4,73 (br, d,  $J = 4\text{ Hz}$ , H-13), 4,41 (m, H-7), 4,24 (d,  $J = 4\text{ Hz}$ , H-14), 4,20 (d,  $J = 7\text{ Hz}$ , H-20a), 4,06 (d,  $J = 7\text{ Hz}$ , H-20b), 3,89 (J 0 (Hz, H-3), 2,29 (s, OAc), 2,22 (s, OAc), 2,04 (s, H-18), 1,66 (s, H-19), 1,25, 1,11 (s, H-16 e H-17).

In un pallone a 4 colli munito di agitatore, gocciolatore, termometro e refrigerante raffreddato a  $-12^\circ\text{C}$  si pongono 52,8 ml di una soluzione 1,9 M di fosgene in toluolo. A questa soluzione sotto agitazione si aggiungono gocciolando in un tempo di 30 minuti 11,6 g di 14-idrossi baccatina III sciolti in 53 ml di cloruro di metilene e 17,5 ml di piridina. La temperatura va mantenuta fra  $-6$  e  $-10^\circ\text{C}$ . Dopo 30 minuti si aggiungono sotto agitazione mantenendo un rigoroso controllo della temperatura 50 ml di soluzione satura di  $\text{NaHCO}_3$ . Si lascia salire al temperatura fino a quella ambiente, quindi si separano le fasi. La fase acquosa si controestrae con metilene cloruro e le fasi organiche si lavano con 45 ml di  $\text{HCl}$  2N portando il pH interno ad 1. La fase

organica si lava con HCL 0,1N e quindi con NaHCO<sub>3</sub>. La fase organica dopo essiccamento su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> si evapora a secco per ottenere in modo quantitativo 11,5 g di 14-idrossibaccatina-1,14 carbonato.

11,5 g di 14-idrossibaccatina-1,14 carbonato si sciolgono in 50 ml di DMF e vengono addizionati a temperatura ambiente di 1,1 equivalenti di clorotrietilsilano e di 3 equivalenti di N-metil-imidazolo. A reazione completa la miscela di reazione si versa in 500 ml di H<sub>2</sub>O ed il precipitato si filtra e si lava abbondantemente con H<sub>2</sub>O. si ottengono dopo essiccamento 12,8 g di 14β-idrossi-7-Tes-baccatina III-1,14 carbonato con caratteristiche identiche a quelle riportate nell'esempio 1.

**Esempio 5: Sintesi di 13-(N-Boc-β-isobutilserinil)-14β-idrossibaccatina III, 1,14 carbonato**

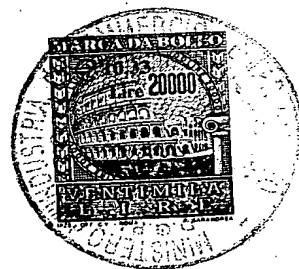
A partire da 14β-idrossi-7-Tes-baccatina III-1,14 carbonato ottenuta come descritto nell'esempio precedente, si procede come segue.

In un pallone da 1L si pongono 20 g di 14β-idrossi-7-Tes-1,14-carbonato-baccatina III insieme a 300 ml di toluene rigorosamente anidro; si aggiungono sciolti in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10 g dell'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-oxazolidine-5-carbossilico e 2 g di N,N-dimetilamminopiridina (DMAP) e 9,5 g di dicicloesilcarbodiimmide (DCC). La miscela di reazione è riscaldata a riflusso per 3h. Si elimina dopo raffreddamento della reazione il prodotto ureico che precipita e le acque madri sono lavate con soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> per l'eliminazione dell'acido non reagito quindi con acido cloridrico diluito per eliminare DMAP e poi ancora con NaHCO<sub>3</sub> fino a neutralità. Si ottengono dopo concentrazione a secco della fase organica 41,5 g di prodotto che può essere usato come tale nella fase successiva.

---

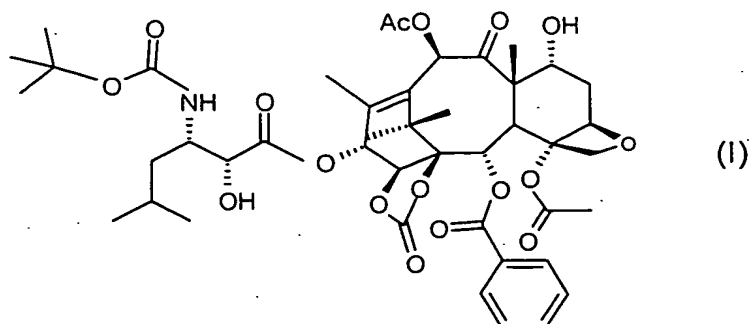
40 g di questo composto vengono deprotetti in due steps per eliminazione del Tes prima e del 2,4-dimetossibenzaldeide dopo. 40 g del composto sono sciolti in 100 ml di una miscela acetonitrile/piridina (80:100) sotto azoto ed il tutto raffreddato a 0°C; si aggiungono 13 ml di fluoruro di piridinio e il tutto è lasciato sotto agitazione per 24 h. La soluzione è versata in 2L di acqua ed il prodotto filtrato ed essiccato sotto vuoto.

Il residuo viene sciolto in 60 ml di metilene cloruro ed a questa soluzione sotto forte agitazione e a 0°C si aggiungono 40 ml di Metanolo HCl 0,6N. La miscela di reazione è lasciata per 2h sotto agitazione, quindi diluita con 150 ml di metilene cloruro e sbattuta con una soluzione di NaHCO<sub>3</sub> aggiustando il pH fra 6-7. La fase organica è concentrata a secco ed il residuo cristallizzato da acetone esano. Si ottengono dopo essiccamento 16,5 g di 13-(N-Boc-β-isobutylisoserinil)-14β-idrossibaccatina III 1,14-carbonato.



## RIVENDICAZIONI

1. Composto di formula (I):



2. Procedimento per la preparazione del composto di formula (I), in cui la 13-(N-Boc- $\beta$ -isobutylisoserinil)-14 $\beta$ -idrossi-baccatina III 1,14-carbonato viene trattata con DBU (diazabicyclo[5,4,0] 7-undecene) in metanolo o THF, o in alternativa viene lasciata in soluzione con metilene cloruro o solventi clorurati da soli o in presenza di alcoli alifatici quali metanolo, etanolo o propanolo e con allumina basica, per un tempo variabile da un'ora a 14 giorni.

3. Procedimento per la preparazione di 13-(N-Boc- $\beta$ -isobutylisoserinil)-14 $\beta$ -idrossi-baccatina III o V 1,14-carbonato, che comprende le seguenti fasi:

- trasformazione della 14 $\beta$ -idrossi-10-desacetilbaccatina III o V nel derivato trietilsililato in posizione 7;
- preparazione del derivato 1,14 carbonato dal prodotto del passaggio (a);
- acetilazione selettiva dell'idrossile in 10;
- reazione del prodotto del passaggio (c) con l'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico;
- eliminazione dei gruppi protettori trietilsilile e dimetossibenilidenico dal prodotto del passaggio (d).

4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui:



protettore trietilsilile nel passaggio (e) viene condotta con fluoruro di piridinio in soluzione di acetonitrile/piridina sotto azoto, e il gruppo protettore dimetossibenzilidenico viene eliminato in solvente di metilene cloruro per aggiunta di metanolo HCl e successivamente di NaHCO<sub>3</sub>.

5. Procedimento per la preparazione di 13-(N-Boc- $\beta$ -isobutylisoserinil)-14 $\beta$ -idrossi-baccatina III o V 1,14-carbonato, che comprende le seguenti fasi:

- a') acetilazione selettiva dell'idrossile al C-10 della 14 $\beta$ -idrossi-10-desacetilbaccatina III o V;
- b') preparazione del derivato 1,14 carbonato dal prodotto del passaggio (a')
- c') sililazione dell'idrossile in C-7;
- d') reazione del prodotto del passaggio (c') con l'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico;
- e') eliminazione dei gruppi protettori trietilsilile e dimetossibenzilidenico dal prodotto del passaggio (d').

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui l'acetilazione selettiva del passaggio (a') viene condotta con anidride acetica in presenza di sali di cerio, scandio, itterbio, preferibilmente CeCl<sub>3</sub>·7H<sub>2</sub>O, e i passaggi (b')-(e') sono condotti in maniera analoga rispettivamente ai passaggi (b), (a), (d) e (e) della rivendicazione 4.

7. Procedimento per la preparazione dell'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico, che comprende le seguenti fasi:

- a) protezione del gruppo amminico del leucinolo con Boc;
- b) trasformazione di N-Boc-L-leucinolo in N-Boc-L-leucinale;
- c) preparazione della cianidrina del prodotto del passaggio (b);

condotti in maniera analoga rispettivamente ai passaggi (b), (a), (d) e (e) della rivendicazione 4.

7. Procedimento per la preparazione dell'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico, che comprende le seguenti fasi:

- a) protezione del gruppo amminico del leucinolo con Boc;
- b) trasformazione di N-Boc-L-leucinolo in N-Boc-L-leucinale;
- c) preparazione della cianidrina del prodotto del passaggio (b);
- d) trasformazione del nitrile della cianidrina nell'acido carbossilico corrispondente;
- e) formazione del metil estere dell'acido carbossilico;
- f) purificazione del metil estere dell'acido (2R, 3S)-3-(N-Boc)ammino-2-idrossi-5-metilesanoico;
- g) condensazione del prodotto del passaggio (f) con 2,4-dimetossibenzaldeide dimetil acetale;
- h) trasformazione dell'estere metilico dell'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico nel corrispondente acido carbossilico.

8. I seguenti intermedi di sintesi: 14 $\beta$ -idrossi baccatina III o V, 14 $\beta$ -idrossi baccatina III o V 1,14 carbonato, 14- $\beta$ -idrossi-7-Tes-10-desacetilbaccatina III o V, 14- $\beta$ -idrossi-7-Tes-baccatina III o V, 14- $\beta$ -idrossi-7-Tes-baccatina III o V 1,14-carbonato, acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutil-1-ossazolidin-5-carbossilico.

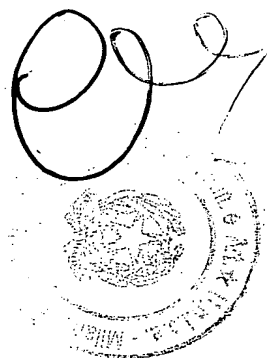
9. Composizione farmaceutica contenente il composto (I) insieme a veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili.

---

10. Uso del composto (I) per la preparazione di un medicamento ad attività antitumorale.

Milano, 6 luglio 1999

Il Mandatario  
(Banfi Paolo)  
di Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.





MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
Ufficio Provinciale Industria Commercio e Artigianato di Milano  
SERVIZIO DEI BREVETTI PER INVENZIONI, MODELLI E MARCHI

COPIA DEL VERBALE DI DEPOSITO DI ISTANZE E DOCUMENTI

L'anno 1999 il giorno ventuno del mese di dicembre

la ditta **INDENA S.p.A.**

il Signor

con sede in **Milano**  
residente



a mezzo mandatari: BIANCHETTI Giuseppe – BRACCO Mauro – BIANCHETTI Marina – MINOJA Fabrizio –  
VERGANI Maria Fiorella – BANFI Paolo ed elettivamente domiciliata agli effetti di legge a Milano, Via Rossini, 8,  
presso **BIANCHETTI BRACCO MINOJA S.r.l.**

**INVENZIONE  
MODELLO  
MARCHIO  
MARCHIO INTERNAZIONALE  
BREVETTO EUROPEO**

- a seguito di domanda per

dep. a Milano il 06.07.1999 con

Protocollo n. MI99A 001483

- ovvero in risposta alla nota ministeriale del

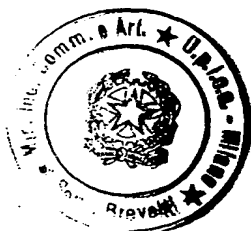
ha depositato presso questo Ufficio i sottoelencati documenti:

- 1) Istanza di correzione formale della domanda di brevetto in oggetto ai sensi dell'articolo 26, D.P.R. 22/6/1979, n. 338;
- 2) No. 1 copia della pagina 31 errata, debitamente postillata;
- 4) No. 1 copia della descrizione contenente le rettifiche apportate.



IL DEPOSITANTE

*Biglin Michela*



L'UFFICIALE ROGANTE

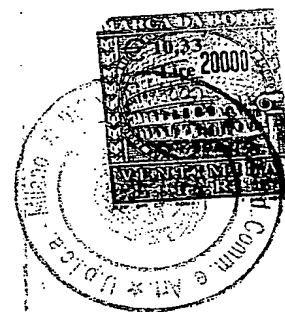
*Giuseppe Rescali*

Per copia conforme all'originale

"Si precisa che per tale domanda e allegati l'imposta di bollo è stata assolta conformemente alla circolare n° 163/83 dell'U.C.B. e succ. modif., con riserva di eventuali integrazioni che saranno dallo stesso richieste in sede di concessione".

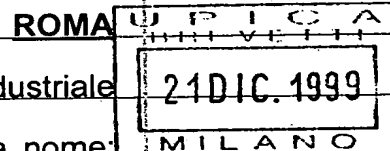
p. il Direttore  
(Maria Giulia Di Noia)

*M. G. Sauli*



37 M On.le Ministero dell'Industria, Commercio e Artigianato

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi



OGGETTO: Domanda di brevetto per invenzione industriale depositata a Milano il 6 luglio 1999 al N. MI99A 001483 a nome: INDENA S.p.A., con sede in Milano, dal titolo: "Derivati tassanici e procedimenti per la loro preparazione"

-----

Con riferimento alla domanda di brevetto in oggetto, si richiede che nelle rivendicazioni vengano apportate le seguenti correzioni formali:

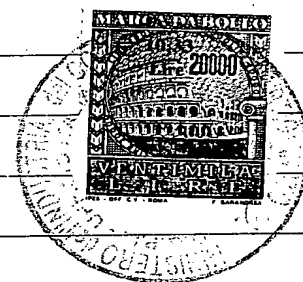
**POSTILLA 1:**

A pag. 31, riga 1 dall'alto, prima di "protettore trietilsilile nel passaggio (e)..." inserire:

"l'agente sililante nel passaggio (a) è trietilclorosilano; il derivato 1,14 carbonato nel passaggio (b) viene preparato utilizzando fosgene in toluene in soluzione di cloruro di metilene/piridina 3:1 in atmosfera di azoto; la riduzione del passaggio (c) viene condotta con LiHMDS in THF anidro, e il 10-idrossi derivato così ottenuto viene successivamente acetilato con acetilcloruro; la reazione di condensazione del passaggio (d) viene condotta in solvente organico apolare anidro, in presenza di una base e dell'agente di condensazione dicicloesilcarbodiimide (DCC); l'eliminazione del gruppo";

**POSTILLA 2**

A pagina 31, eliminare da "condotti in maniera analoga..." (riga 18



POSTILLA 1

protettore trietilsilile nel passaggio (e) viene condotta con fluoruro di piridinio in soluzione di acetonitrile/piridina sotto azoto, e il gruppo protettore dimetossibenzilidenico viene eliminato in solvente di metilene cloruro per aggiunta di metanolo HCl e successivamente di NaHCO<sub>3</sub>.

5. Procedimento per la preparazione di 13-(N-Boc- $\beta$ -isobutylisoserinil)-14 $\beta$ -idrossi-baccatina III o V 1,14-carbonato, che comprende le seguenti fasi:

- a') acetilazione selettiva dell'idrossile al C-10 della 14 $\beta$ -idrossi-10-desacetilbaccatina III o V;
- b') preparazione del derivato 1,14 carbonato dal prodotto del passaggio (a')
- c') sililazione dell'idrossile in C-7;
- d') reazione del prodotto del passaggio (c') con l'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutyl-1-ossazolidin-5-carbossilico;
- e') eliminazione dei gruppi protettori trietilsilile e dimetossibenzilidenico dal prodotto del passaggio (d').

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui l'acetilazione selettiva del passaggio (a') viene condotta con anidride acetica in presenza di sali di cerio, scandio, itterbio, preferibilmente CeCl<sub>3</sub>.7H<sub>2</sub>O, e i passaggi (b')-(e') sono

POSTILLA 2

condotti in maniera analoga rispettivamente ai passaggi (b), (a), (d) e (e) della rivendicazione 4.

7. Procedimento per la preparazione dell'acido (4S, 5R)-N-Boc-2-(2,4-dimetossifenil)-4-isobutyl-1-ossazolidin-5-carbossilico, che comprende le seguenti fasi:

- a) protezione del gruppo amminico del leucinolo con Boc;
- b) trasformazione di N-Boc-L-leucinolo in N-Boc-L-leucinale;
- c) preparazione della cianidrina del prodotto del passaggio (b);